บทปฏิบัติการเรื่อง
การเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์

ดร. นวรัตน์ นันทพงษ์

การเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ (Microbial cultivation)

จุลินทรีย์จัดเป็นสิ่งมีชีวิตที่มีขนาดเล็ก ดังนั้นแม้ว่าจุลินทรีย์อาศัยอยู่ทั่วไปในสภาพแวดล้อมรอบ ๆ ตัวเรา แต่เราก็ไม่สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า จุลินทรีย์ส่วนใหญ่จะพบอาศัยอยู่ตามสภาพแวดล้อมที่สมบูรณ์ มีสารอาหารเพียงพอ แต่จุลินทรีย์บางชนิดก็พบอาศัยอยู่ในสภาวะวิกฤต เช่น แหล่งที่มีอุณหภูมิสูงหรือต่ำมาก ๆ บริเวณที่มีปริมาณออกซิเจนน้อยหรือไม่มีเลย แหล่งที่มีความเค็มสูง เป็นต้น ดังนั้นการที่จะเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ในห้องปฏิบัติการจึงต้องพิจารณาว่าจะเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ชนิดใด เพื่อที่จะจัดเตรียมสภาวะแวดล้อมต่าง ๆ ให้เหมาะสมกับจุลินทรีย์ที่เราต้องการเพาะเลี้ยง

อาหารสำหรับเลี้ยงจุลินทรีย์

สิ่งสำคัญอันดับแรก ๆ ที่ต้องคำนึงถึงในการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ในห้องปฏิบัติการ คือ อาหารเลี้ยงเชื้อ (culture medium) เนื่องจากจุลินทรีย์แต่ละชนิดมีความต้องการสารอาหารเพื่อใช้ในการเจริญและการทำกิจกรรมต่าง ๆ ภายในเซลล์ที่แตกต่างกัน ดังนั้นอาหารเลี้ยงเชื้อที่นำมาใช้ควรเลือกให้เหมาะสมกับชนิดของจุลินทรีย์ที่จะทำการเพาะเลี้ยง โดยทั่วไปอาหารเลี้ยงเชื้อมักประกอบไปด้วยธาตุอาหารหลักที่มีความสำคัญต่อจุลินทรีย์ เช่น amino acids, polysaccharides (sugars) และ vitamins เป็นต้น นอกจากนี้อาจมีการเติมสารบางอย่างที่มีความจำเพาะต่อจุลินทรีย์ชนิดหนึ่ง ๆ เพื่อใช้ในการจัดจำแนกหรือคัดเลือกจุลินทรีย์ที่ต้องการออกจากจุลินทรีย์ชนิดอื่น

คุณสมบัติที่สำคัญของอาหารเลี้ยงจุลินทรีย์ ได้แก่

1. มีชนิดและปริมาณของธาตุอาหารที่เหมาะสม
2. มีความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสม
3. ไม่มีสารพิษที่อาจมีผลในการทำลาย หรือยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์
4. ไม่มีสิ่งมีชีวิตใด ๆ ปนเปื้อนอยู่ในอาหาร

การเตรียมอาหารลี้ยงเชื้อเพื่อใช้ในงานจุลชีววิทยาสามารถเตรียมได้หลายลักษณะ ได้แก่ อาหารเหลว (liquid medium หรือ broth) อาหารแข็ง (solid medium) หรืออาหารกึ่งแข็ง (semisolid) การเตรียมอาหารแข็งจะมีการเติมวุ้น (agar) ปริมาณ 1.5 – 2 % ลงไปในส่วนผสมของอาหารนั้น ๆ ส่วนอาหารกึ่งแข็งจะเติมวุ้นเพียง 0.3 – 0.5 % โดยทั่วไปการตรวจหาเชื้อจุลินทรีย์ในทางคลินิกมักใช้อาหาร

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

เหลวในการทดสอบความสามารถของเชื้อในการสร้างแก๊ส การเปลี่ยนแปลงของ pH ในอาหารที่เป็นผลมาจากสารผลิตภัณฑ์ที่จุลินทรีย์สร้างขึ้นโดยสังเกตจากการเปลี่ยนสีของ indicator ที่ใส่ลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อ อาหารแข็งมักใช้เพื่อตรวจสอบลักษณะของโคโลนี ได้แก่ สี รูปร่าง และ ขนาดของโคโลนีที่เกิดขึ้นบนผิวหน้าของอาหาร สำหรับอาหารกึ่งแข็งจะใช้เพื่อทดสอบความสามารถในการเคลื่อนที่ของจุลินทรีย์

อาหารเลี้ยงเชื้อแบ่งออกเป็นหลายชนิดตามลักษณะการใช้งาน เช่น

1. Basic medium อาหารชนิดนี้ประกอบด้วยสารอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญของจุลินทรีย์ทั่ว ๆ ไป ไม่มีสารอาหารพิเศษสำหรับส่งเสริมให้จุลินทรีย์มีการเจริญเติบโตที่ดีและรวดเร็ว นิยมใช้สำหรับเพาะเลี้ยงเชื้อที่เป็นเชื้อบริสุทธิ์ หรือใช้ในการเก็บ stock เชื้อ ตัวอย่างของอาหารชนิดนี้ เช่น nutrient agar
2. Enriched medium เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการเติมสารอาหารพิเศษที่ส่งเสริมการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดที่ต้องการ ให้สามารถเจริญได้ดี เป็นผลให้จุลินทรีย์เพิ่มจำนวนมากขึ้น ตัวอย่างของสารอาหารพิเศษเหล่านี้ ได้แก่ เลือด ซีรัม อาหารเลี้ยงเชื้อประเภทนี้ เช่น blood agar, chocolate agar เป็นต้น
3. Selective medium อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดนี้จะมีการเติมสารที่ไปยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการ และจะส่งเสริมการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดที่ต้องการให้สามารถเจริญได้ ดังนั้นในทางการแพทย์อาหารประเภทนี้จึงใช้ในการคัดแยกเชื้อที่สงสัยว่าเป็นสาเหตุของโรคออกจากเชื้อชนิดอื่น เช่น *Salmonella-Shigella* agar (SS agar) เป็นต้น
4. Differential medium อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดนี้จะมีการเติมสารบางชนิด เช่น สี pH indicators หรือสารบางอย่างที่มีคุณสมบัติในการจำแนกจุลินทรีย์ที่ต้องการออกจากจุลินทรีย์ชนิดอื่นตามคุณสมบัติจำเพาะของเชื้อ เช่น สีของโคโลนีที่ไม่เหมือนกัน หรือจุลินทรีย์ต่างชนิดกันมีความสามารถที่จะใช้สารอาหารที่อยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อได้ไม่เหมือนกัน สารอาหารในบริเวณที่เซลล์เจริญเกิดการย่อยที่ต่างกัน ส่งผลให้ลักษณะของอาหารในบริเวณดังกล่าวมีการเปลี่ยนแปลงที่แตกต่างกันไป เช่น ทำให้เกิดบริเวณใส (clear zone) รอบโคโลนีที่เชื้อเจริญ มีตะกอนเกิดขึ้นในอาหาร เป็นต้น อาหารเลี้ยงเชื้อในกลุ่มนี้ เช่น MacConkey agar

อาหารบางชนิดอาจมีคุณสมบัติเป็นทั้ง selective medium และ differential medium เช่น thiosulfate citrate bile salt sucrose agar (TCBS)

5. Transfer medium เป็นอาหารสำหรับใช้ในการเก็บสิ่งส่งตรวจเพื่อจะนำมาเพาะเลี้ยงเชื้อในห้องปฏิบัติการ ในกรณีที่ไม่สามารถส่งตัวอย่างนั้นไปยังห้องปฏิบัติการได้ทันที ส่วนประกอบหลักของอาหารชนิดนี้จะต้องมีความสามารถที่จะคงสภาพของจุลินทรีย์ก่อโรค เพื่อให้จุลินทรีย์จากสิ่งส่งตรวจที่ขนส่งไปยังห้องปฏิบัติการมีชีวิตรอด และสามารถนำไปเพาะเลี้ยงในอาหารชนิดอื่นที่เหมาะสม เพื่อใช้ในการตรวจวิเคราะห์ต่อไป ตัวอย่างของอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดนี้ ได้แก่ Amies modified transport medium with charcoal

นักศึกษาจะได้เรียนรู้และฝึกปฏิบัติเทคนิคการถ่ายเชื้อ (inoculation) ซึ่งเป็นเทคนิคที่นำมาใช้ในการเก็บและแยกเชื้อจากสิ่งส่งตรวจของผู้ป่วย เพื่อนำไปพิสูจน์หาเชื้อที่เป็นสาเหตุของโรคต่อไป ซึ่งโดยปกติหน้าที่นี้จะทำโดยผู้ชำนาญการ (technician) ในห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา อย่างไรก็ดีแพทย์ควรเรียนรู้หลักการถ่ายเชื้อในเบื้องต้น และหากเมื่อต้องปฏิบัติจริงก็จะสามารถทำได้อย่างถูกต้อง

วิธีการถ่ายเชื้อจุลินทรีย์ไม่ให้เกิดการปนเปื้อน

การถ่ายเชื้อ (inoculation) จะต้องกระทำอย่างระมัดระวังเพื่อป้องกันการปนเปื้อนของเชื้อชนิดอื่นจากสิ่งแวดล้อม รวมถึงป้องกันเชื้อที่เรากำลังแยกไม่ให้ปนเปื้อนกับสิ่งอื่น วิธีการดังกล่าวนี้เรียกว่า Aseptic technique หรือ Sterile technique ซึ่งในการปฏิบัติงานทางจุลชีววิทยาควรปฏิบัติดังนี้

1. ทำความสะอาดโต๊ะปฏิบัติการทั้งก่อนและหลังการปฏิบัติด้วยน้ำยาฆ่าเชื้อ เช่น แอลกอฮอล์ 70% เพื่อช่วยลดอัตราการติดเชื้อ
2. ล้างมือให้สะอาดทุกครั้ง ทั้งก่อนและหลังการปฏิบัติการ
3. ของใช้ในปฏิบัติการต้องผ่านการฆ่าเชื้อด้วยวิธีที่เหมาะสม เช่น ต้องลนไฟห่วงเขี่ยเชื้อ (loop) ก่อนและหลังการใช้ อุปกรณ์อื่น ๆ เช่น ปิเปต หลอดทดลอง และจานเพาะเชื้อ ควรผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว
4. ทำงานอย่างรวดเร็วเพื่อลดโอกาสติดเชื้อ

อุปกรณ์หลักสำหรับใช้ถ่ายเชื้อจากสิ่งส่งตรวจลงอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม คือ ห่วงเขี่ยเชื้อ (inoculating loop, loop) ประกอบด้วยด้ามจับกับส่วนที่เป็นลวดซึ่งยื่นต่อออกมาจากส่วนด้ามจับโดยบริเวณปลายลวดจะถูกขดให้เป็นวงกลม ตัวลวดมักทำมาจาก nicrome หรือ platinum ซึ่งเป็นส่วนที่จะสัมผัสกับจุลินทรีย์หรือสิ่งส่งตรวจ ซึ่งต้องเผาให้ร้อนแดง ทั้งก่อนและหลังการถ่ายเชื้อเพื่อเป็นการทำลายเชื้อป้องกันไม่ให้เกิดการปนเปื้อน

โดยทั่วไปการเลี้ยงเชื้อในห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาสามารถทำได้หลายวิธี และนอกจากนี้ยังมีอุปกรณ์อีกหลายชนิดที่ใช้ในการเพาะเชื้อจุลินทรีย์ แต่นักศึกษาแพทย์ไม่มีความจำเป็นต้องเรียนรู้วิธีการทั้งหมดนี้ ดังนั้นในบทปฏิบัติการนี้นักศึกษาจะได้เรียนรู้และฝึกฝนการถ่ายเชื้อโดยใช้ห่วงเขี่ยเชื้อ และ การแยกเชื้อให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ (pure culture) โดยการ streak plate ซึ่งจัดเป็นเทคนิคเบื้องต้นที่สำคัญในการตรวจหาเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค

วัตถุประสงค์การทดลอง

1. เพื่อให้นักศึกษาสามารถใช้เทคนิคปลอดเชื้อทำการถ่ายเชื้อสำหรับเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ด้วยห่วงเขี่ยเชื้อได้อย่างถูกต้อง โดยไม่ให้เกิดการปนเปื้อนจากเชื้อชนิดอื่นลงในหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อ
2. เพื่อให้นักศึกษาสามารถใช้เทคนิค cross streak ในการแยกเชื้อ เพื่อให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ ที่จะพบเป็นโคโลนีเดี่ยว ๆ บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อได้

การทดลองที่ 1.1.1 การถ่ายเชื้อด้วยห่วงเขี่ยเชื้อ

วัสดุและอุปกรณ์

1. ห่วงเขี่ยเชื้อ (loop)
2. ตะเกียงแอลกอฮอล์
3. อาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient broth (NB) ปลอดเชื้อ 2 หลอด
4. น้ำกลั่นปลอดเชื้อ 1 หลอด
5. ตู้บ่มเลี้ยงเชื้อ (incubator)
6. ปากกาเขียนแก้ว

วิธีการปฏิบัติ

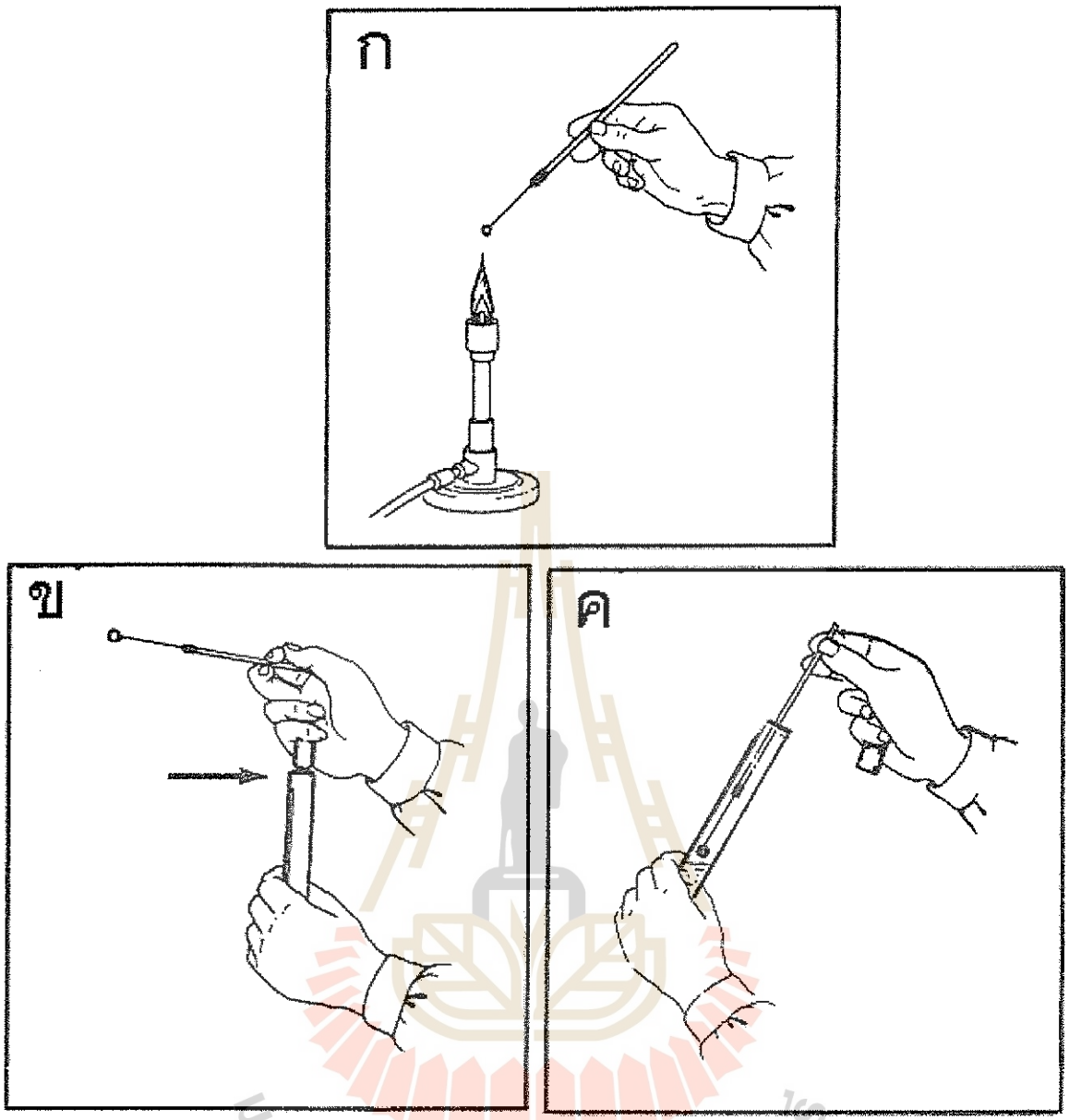
1. เขียนรายละเอียดต่าง ๆ เช่น control (หลอดที่ใช้เป็นหลอดคุม) น้ำกลั่น (หลอดที่จะถ่ายน้ำกลั่นลงไป) วันที่ทำ ชื่อผู้ทำ หมู่ที่ ลงบนหลอดอาหาร NB
2. เผา loop ด้วยตะเกียงแอลกอฮอล์ จนลวดร้อนแดงตลอดเส้น รอให้เย็น
3. เปิดฝาหลอดน้ำกลั่นออกด้วยมือที่ไม่ได้ถือหลอดโดยการใช้นิ้วที่ถนัดคีบไว้ นำปากหลอดไปผ่านเปลวไฟ ประมาณ 2 – 3 ครั้ง
4. ใช้ loop ที่ผ่านการเผาฆ่าเชื้อจนร้อนแดงและเย็นแล้วจุ่มลงไปในหลอดน้ำกลั่น ให้น้ำกลั่นติดอยู่ในวงกลมที่อยู่บริเวณปลายลวด ค่อย ๆ นำ loop ออกจากหลอดน้ำกลั่น (ระวังอย่าให้ตัวอย่างน้ำกลั่นหยดลงบนโต๊ะปฏิบัติการ)
5. นำปากหลอดน้ำกลั่นไปผ่านเปลวไฟ ประมาณ 2 – 3 ครั้ง ปิดฝาหลอด
6. เปิดฝาหลอด NB ออก นำปากหลอดไปผ่านเปลวไฟ ประมาณ 2 – 3 ครั้ง

7. จุ่ม loop ที่มีตัวอย่างน้ำกลั่นลงไปในหลอด NB ให้น้ำกลั่นที่ปลายลวดผสมไปกับอาหาร NB ที่อยู่ในหลอด นำ loop ออกจากหลอด
8. ทำการฆ่าเชื้อบริเวณปากหลอด NB โดยการนำไปผ่านเปลวไฟ แล้วจึงปิดฝาหลอด
9. ทำการฆ่าเชื้อที่ loop อีกครั้งโดยนำไปเผาให้ร้อนแดง
10. บ่มหลอด NB ที่ถ่ายน้ำกลั่นปลอดเชื้อลงไปแล้ว กับหลอด NB ที่ไม่ได้ถ่ายน้ำกลั่นลงไป (control) ที่อุณหภูมิห้อง ประมาณ 2 – 3 วัน

การตรวจผล

ให้นักศึกษาสังเกตดูว่าหลอด NB ที่ถ่ายน้ำกลั่นปลอดเชื้อลงไปมีการเปลี่ยนแปลงเกิดขึ้นหรือไม่ โดยการเปรียบเทียบกับหลอด control หากหลอดที่มีน้ำกลั่นไม่มีการเปลี่ยนแปลงใด ๆ แสดงว่านักศึกษาถ่ายเชื้อได้อย่างถูกวิธี ไม่มีการปนเปื้อนของเชื้อจากภายนอก เพราะในน้ำกลั่นปลอดเชื้อจะไม่มีจุลินทรีย์ใด ๆ อยู่ เนื่องจากผ่านการฆ่าเชื้อมาแล้ว ดังนั้นหากอาหาร NB ที่นักศึกษาถ่ายน้ำกลั่นลงไปเกิดการเปลี่ยนแปลง เช่น อาหารขุ่น มีแผ่นฝ้า ตะกอน หรือสีของอาหารเปลี่ยนไป มีเส้นใยเกิดขึ้น เป็นต้น แสดงว่ามีการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์จากภายนอกในขั้นตอนใดขั้นตอนหนึ่งของการทำ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเทคนิคการถ่ายเชื้อของนักศึกษายังไม่ถูกต้อง

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี



รูปที่ 1.1 วิธีการย้ายเชื้อด้วย loop

ก. การเผา loop

ข. การเปิดฝาหลอด โดยหนีบไว้ระหว่างนิ้ว

ค. การใส่ loop ลงไปในหลอด เพื่อถ่ายเชื้อ

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

การทดลองที่ 1.1.2 การทำเชื้อให้บริสุทธิ์โดยการ streak plate (cross streak)

วัสดุและอุปกรณ์

1. ห่วงเขี่ยเชื้อ (loop)
2. ตะเกียงแอลกอฮอล์
3. อาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient agar (NA) ปลอดเชื้อ 1 จาน
4. เชื้อผสมของ *Escherichia coli* และ *Serratia macescens* ที่เจริญอยู่บนจานอาหาร NA
5. ตู้บ่มเลี้ยงเชื้อ (incubator)
6. ปากกาเขียนแก้ว

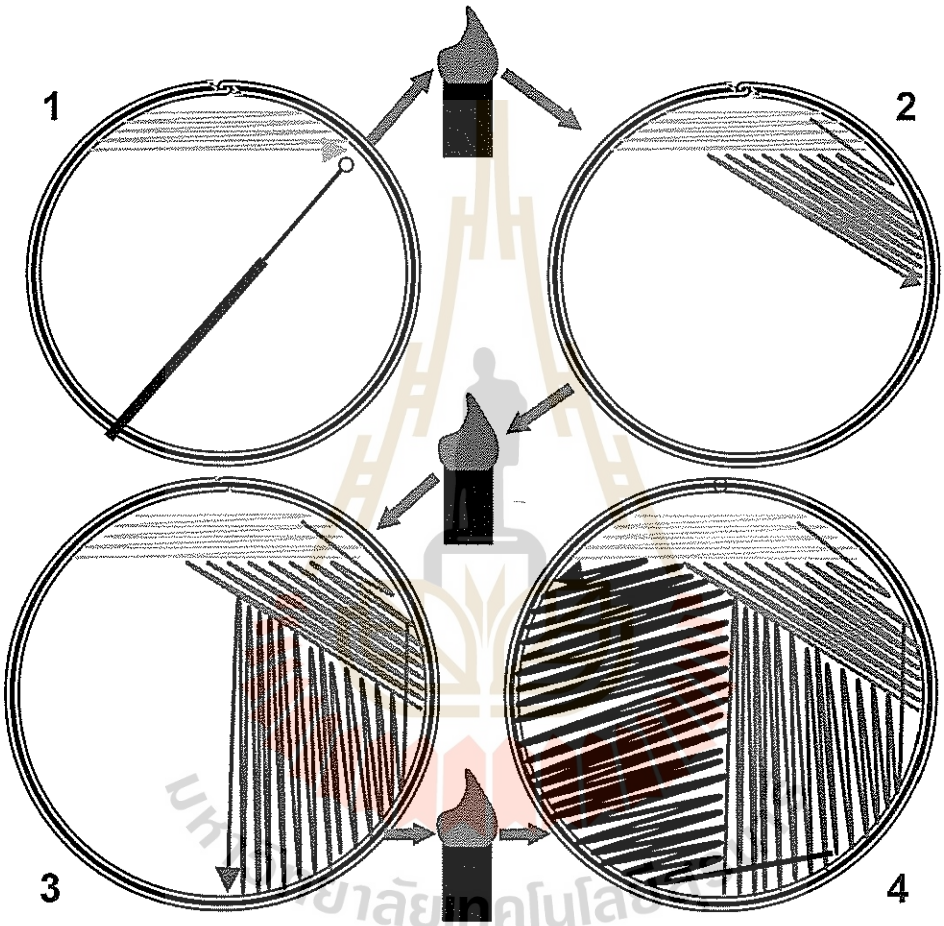
วิธีการปฏิบัติ

1. เขียนชื่อแบคทีเรีย วันที่ทำ ชื่อผู้ทำ หมู่ที่ ลงบนจานอาหาร NA บริเวณก้นจาน เพื่อป้องกันความผิดพลาดในการวิเคราะห์เชื้อจุลินทรีย์จากสิ่งส่งตรวจ เนื่องจากในบางกรณีที่ผู้ทำการทดลองขาดความระมัดระวัง อาจทำฝาจานอาหารเลี้ยงเชื้อสลับกันได้
2. เผา loop ด้วยตะเกียงแอลกอฮอล์ จนลวดร้อนแดงตลอดเส้น รอให้เย็น
3. นำ loop ที่เย็นแล้วป้ายเชื้อจากจานอาหารที่มีเชื้อผสมของ *Escherichia coli* และ *Serratia macescens* มาเล็กน้อย
4. เปิดฝาจานอาหาร NA ที่นักศึกษาได้ทำการ label ที่ก้นจานไว้ก่อนหน้านี้ นำ loop ที่ป้ายเชื้อผสมแล้วจาก ข้อ 3 ไปขีดลากลงบนผิวหน้าอาหารที่ขอบด้านใดด้านหนึ่งของจาน ลากไปมาเบา ๆ ประมาณ 4 – 5 เส้น (ให้นับเป็นแนวแรกของการ streak (ขีดลาก)) โดยลากเส้นให้ถี่ ๆ ชิดกัน (ดังรูปที่ 1.2) ปิดฝาจาน
5. เผา loop ให้ร้อนแดง (เพื่อลดปริมาณของเชื้อให้น้อยลง ทำให้มีโอกาสที่จะแยกเชื้อบริสุทธิ์ได้มากขึ้น) แล้วปล่อยให้เย็น
6. หมุนจานอาหารเล็กน้อย เปิดฝา ใช้ loop ทำการ streak ครั้งที่ 2 โดยต้องลากลวดเขี่ยเชื้อให้ผ่านรอยเชื้อที่ขีดไว้ในรอบแรกก่อน 1 ครั้ง แล้วค่อยขีดเส้นลากไปมาบนผิวอาหารถี่ ๆ (นับเป็นแนวที่สองของการ streak) ปิดฝาจาน

7. ทำซ้ำในข้อ 5 และ ข้อ 6 จนได้แนวของการ streak ประมาณ 4 แนว โดยพื้นที่ผิวของอาหารในจานควรมีรอยขีดลากอยู่เต็ม ควรให้มีพื้นที่ว่างเหลืออยู่น้อยที่สุด

8. บ่มเชื้อในลักษณะคว่ำจานที่อุณหภูมิห้อง ประมาณ 24 – 48 ชั่วโมง

หมายเหตุ การคว่ำจานอาหารก่อนที่จะนำไปบ่ม เป็นการป้องกันไม่ให้หยดน้ำที่เกิดขึ้นระหว่างการบ่มและเกาะอยู่บนฝาจานเลี้ยงเชื้อ หยดลงบนผิวหน้าอาหารที่มีการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์อยู่ ซึ่งอาจนำไปสู่การปนเปื้อนของเชื้อได้



รูปที่ 1.2 แสดงการทำ cross streak

การตรวจผล

ให้ตรวจดูว่ามีโคโลนีเดี่ยวของเชื้อเจริญขึ้นบนผิวหน้าอาหารหรือไม่ ถ้ามีให้สังเกตว่าลักษณะของโคโลนีที่เกิดขึ้นมีความแตกต่างกันอย่างไร เช่น สี ความนูน ความมันวาว ขนาด ขอบโคโลนี แต่ถ้าไม่พบโคโลนีเดี่ยว ๆ เกิดขึ้น แสดงว่านักศึกษายังทำเทคนิคการแยกเชื้อได้ไม่ดีเท่าที่ควร

รายงานผลการทดลอง

การเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์

ชื่อ-สกุล.....รหัสประจำตัว.....

กลุ่มปฏิบัติการ.....วันที่.....

การทดลองที่ 1.1.1 การถ่ายเชื้อด้วยห่วงเขี่ยเชื้อ

บรรยายลักษณะของอาหาร NB

.....

.....

.....

.....

.....

การทดลองที่ 1.1.2 การทำเชื้อให้บริสุทธิ์โดยการ streak plate (cross streak)

บรรยายลักษณะโคโลนีของเชื้อที่เจริญบนจานอาหาร NA

.....

.....

.....

.....

.....

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทปฏิบัติการเรื่อง
การควบคุมจุลินทรีย์

ดร. นวรัตน์ นันทพงษ์

จุลินทรีย์ที่พบอยู่ทั่วไปในสภาพแวดล้อมบางชนิดก็เป็นประโยชน์บางชนิดก็ให้โทษ ตัวอย่างของจุลินทรีย์กลุ่มที่ให้โทษที่เห็นได้อย่างชัดเจนคือเชื้อก่อโรค การแพร่กระจายของจุลินทรีย์กลุ่มนี้อาจนำไปสู่การเกิดโรคระบาดที่ร้ายแรง ดังนั้นจึงต้องมีกระบวนการที่เหมาะสมในการควบคุมจุลินทรีย์ก่อโรคเหล่านี้

ในบทปฏิบัติการนี้นักศึกษาจะได้ทำการทดลองการใช้วิธีทางกายภาพ (physical methods) และทางเคมี (chemical methods) ในการควบคุมจุลินทรีย์ เพื่อศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพของกระบวนการที่ใช้และเปรียบเทียบความทนทานของเชื้อชนิดต่าง ๆ ต่อวิธีการควบคุมจุลินทรีย์ที่ได้นำมาทดลองปฏิบัติ

วัตถุประสงค์การทดลอง

1. เพื่อให้นักศึกษาได้เรียนรู้และทำความเข้าใจในวิธีการกำจัดและยับยั้งจุลินทรีย์โดยวิธีทางกายภาพและวิธีทางเคมี
2. เพื่อให้นักศึกษาได้เปรียบเทียบประสิทธิภาพของวิธีการควบคุมจุลินทรีย์แบบต่าง ๆ และเปรียบเทียบความทนทานของเชื้อแต่ละชนิดต่อปัจจัยที่ใช้ในการควบคุมจุลินทรีย์

ตอนที่ 1 Physical methods

การทดลองที่ 1.1 ประสิทธิภาพของการทำ Pasteurization, Boiling และ Autoclaving ในการควบคุมจุลินทรีย์

วัสดุและอุปกรณ์

1. ปากกาเขียนแก้ว
2. nutrient broth (NB) 8 หลอด
3. ปิเปตปลอดเชื้อ และ pipette pump
4. water bath, autoclave, อ่างน้ำเย็น
5. ตะเกียงแอลกอฮอล์

เชื้อจุลินทรีย์

1. *Escherichia coli*
2. *Bacillus subtilis*

วิธีการทดลอง

1. ปิเปตเชื้อ *E. coli* ลงใน NB 4 หลอด หลอดละ 1 ml และ เชื้อ *B. subtilis* ลงใน NB 4 หลอด หลอดละ 1 ml (ควรผสมเชื้อให้เข้ากันดีทั่วทั้งหลอดก่อนทำการปิเปต)
2. นำหลอด NB ที่มีเชื้อ *E. coli* หรือ *B. subtilis* ไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิต่าง ๆ ดังนี้

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

หลอดที่ 1 ไม่ต้องทำอะไร (หลอดคุม)

หลอดที่ 2 นำไปแช่ในอ่างน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 63°C นาน 30 **นาที** นำออกมาทำให้เย็นลง โดยการแช่ในอ่างน้ำเย็นทิ้งไว้สักครู่

หลอดที่ 3 นำไปแช่ในอ่างที่มีน้ำเดือด (100°C) นาน 10 **นาที** นำออกมาทำให้เย็นลง โดยการแช่ในอ่างน้ำเย็นทิ้งไว้สักครู่

หลอดที่ 4 นำไปเข้า autoclave ที่ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121°C นาน 15 **นาที**

3. นำหลอดทั้งหมดไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1-2 วัน แล้วตรวจผล

หมายเหตุ: เมื่อจะเริ่มทำการทดลอง ควรเขียนชื่อเชื้อ อุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในการควบคุมจุลินทรีย์ ไว้ที่ข้างหลอดก่อน

การตรวจผล

ตรวจดูการเจริญของเชื้อหลังจากได้รับความร้อนที่ระดับต่าง ๆ เทียบกับหลอดคุม โดยดูจากความขุ่นของอาหาร บันทึกผลที่ได้ลงในรายงานผลการทดลอง พร้อมทั้งสรุปว่าความร้อนในระดับต่าง ๆ มีผลต่อการเจริญของเชื้ออย่างไร และเชื้อชนิดใดมีความทนทานต่อความร้อนมากกว่ากัน

การทดลองที่ 1.2 ประสิทธิภาพของแสง Ultraviolet (UV) ในการควบคุมจุลินทรีย์

วัสดุและอุปกรณ์

1. ปากกาเขียนแก้ว
2. nutrient agar 6 จาน
3. malt yeast extract agar 2 จาน (ใช้ในการเพาะเลี้ยง spore ของ *Aspergillus niger*)
4. ปิเปตปลอดเชื้อ และ pipette pump
5. UV chamber
6. แท่งแก้วงอ (spreader) และ 95% ethanol
7. ตะเกียงแอลกอฮอล์

เชื้อจุลินทรีย์

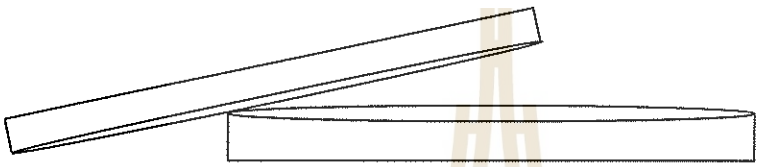
1. *Escherichia coli*
2. *Bacillus subtilis*
3. *Serratia marcescens*
4. spore suspension ของ *Aspergillus niger*

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

วิธีการทดลอง

1. ปิเปตเชื้อ *E. coli* ลงบน nutrient agar 2 จาน จานละ 0.1 ml
2. นำ spreader ไปจุ่มใน 95% ethanol แล้วผ่านไฟ รอให้เย็น มาเกลี่ยเชื้อบนผิวหน้าอาหารให้กระจายอย่างสม่ำเสมอ ทั่วทั้งจาน หลังจากนั้นให้นำ spreader ไปจุ่มใน 95% ethanol แล้วผ่านไฟ เพื่อทำลายจุลินทรีย์ที่ติดมากับ spreader ระหว่างการเกลี่ยเชื้อ
3. นำจานอาหารที่เกลี่ยเชื้อแล้วไปใส่ใน UV chamber โดยปฏิบัติดังนี้

   จานที่ 1 ใช้ปากกาเขียนแก้วขีดแบ่งใต้จานออกเป็นสองส่วน แล้วนำจานอาหารไปใส่ใน UV chamber เป็นเวลา 5 **นาที** โดยให้เปิดฝาจานอาหารออกครึ่งหนึ่ง เพื่อแบ่งจานอาหารออกเป็นสองส่วนตามแนวของเส้นที่ขีดไว้ ทำให้ส่วนหนึ่งรับแสง UV โดยตรง อีกส่วนหนึ่งมีฝาจานมากั้นไว้ (ดังรูป)



   จานที่ 2 ทำเหมือนกับจานที่ 1 แต่ให้ทิ้งจานอาหารไว้ใน UV chamber เป็นเวลา 20 **นาที**
4. ให้นักศึกษาปฏิบัติเหมือนกันนี้กับเชื้อ *B. subtilis*, *S. marcescens* และ spore suspension ของ *A. niger* ในกรณีที่เป็น spore suspension ของ *A. niger* ให้ใช้อาหาร malt yeast extract agar
5. นำจานอาหารทั้งหมดไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2-3 วัน แล้วตรวจผล

หมายเหตุ: เมื่อจะเริ่มทำการทดลอง ควรเขียนชื่อเชื้อ ส่วนที่ถูกปิดด้วยฝาจาน ระยะเวลาในการรับแสง UV ไว้ที่ใต้จานอาหารก่อนเสมอ

การตรวจผลการทดลอง

เปรียบเทียบการเจริญของเชื้อแต่ละชนิดในส่วนที่เปิดรับแสง UV และส่วนที่ถูกปิดไว้ด้วยฝาจาน ปริมาณการเจริญของเชื้อทั้ง 2 ส่วนเหมือนหรือแตกต่างกันอย่างไรเมื่อเพิ่มเวลาในการรับแสง UV จาก 5 นาที เป็น 20 นาที บันทึกผลที่ได้ลงไปในรายงานผลการทดลอง พร้อมทั้งสรุปว่าเชื้อที่ใช้ในการทดลองมีความทนทานต่อแสง UV มากหรือน้อยกว่ากันอย่างไร

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตอนที่ 2 Chemical methods

การทดลองที่ 2.1 ประสิทธิภาพของสารเคมีชนิดต่าง ๆ ต่อการควบคุมจุลินทรีย์

วัสดุและอุปกรณ์

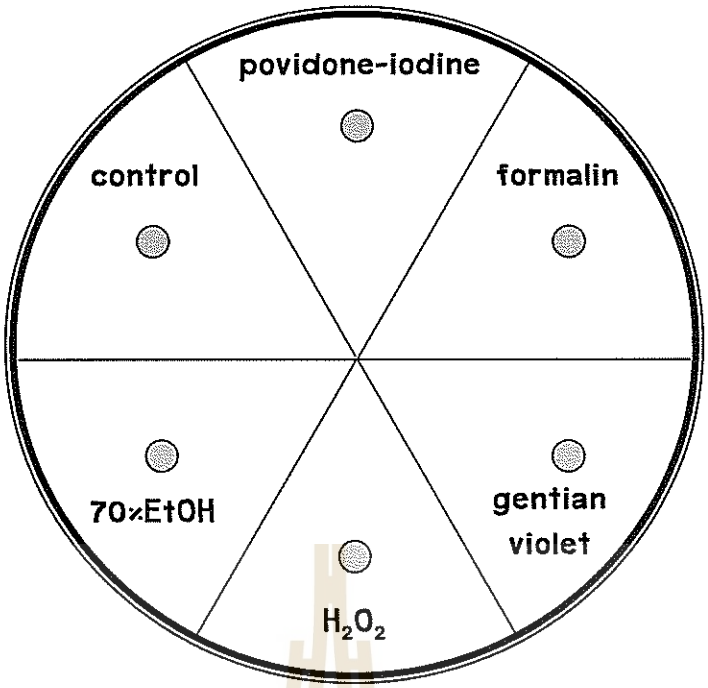
1. ปากกาเขียนแก้ว
2. nutrient agar 4 จาน
3. cotton swab ปลอดเชื้อ
4. paper disc (กระดาษตาปลา) ปลอดเชื้อ
5. forceps และ 95% ethanol
6. ตะเกียงแอลกอฮอล์
7. สารเคมีที่ใช้: 10% povidone-iodine (betadine), formalin, gentian violet, hydrogen peroxide, 70% ethanol

เชื้อจุลินทรีย์

1. *Escherichia coli*
2. *Bacillus subtilis*
3. *Serratia marcescens*
4. *Staphylococcus aureus*

วิธีการทดลอง

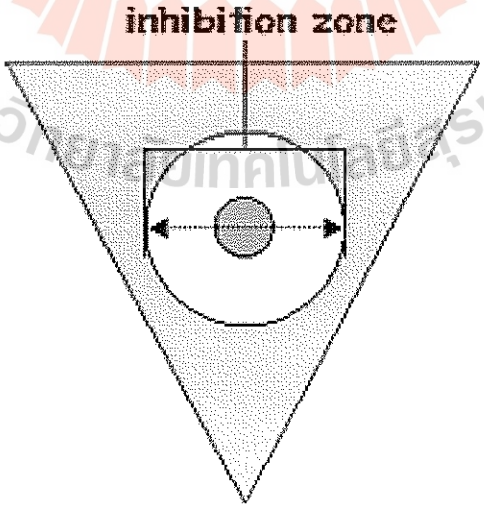
1. ใช้ปากกาเขียนแก้วแบ่งด้านล่างของจานอาหาร Nutrient agar ออกเป็น 6 ส่วนเท่า ๆ กัน เขียนชื่อสารเคมีแต่ละชนิดกำกับไว้ในแต่ละส่วน โดยให้ส่วนหนึ่งเป็น control
2. เจือจางเชื้อที่ต้องการทดสอบ ได้แก่เชื้อ *E. coli*, *B. subtilis*, *S. marcescens* และ *S. aureus* ด้วยน้ำเกลือ ให้มีความขุ่นเท่ากับ Mc Farland no. 0.5 (1% $BaCl_2$ 0.5 ml + 1% H_2SO_4 99.5 ml) ซึ่งที่ความขุ่นระดับนี้จะมีจำนวนเชื้อโดยประมาณเท่ากับ 1.5×10^8 cell/ml
3. ใช้ cotton swab ปลอดเชื้อ จุ่มเชื้อที่เจือจางแล้วจนชุ่ม กด cotton swab กับข้างหลอดให้พอหมาด แล้วนำมาป้ายลงบนผิวหน้าของอาหาร nutrient agar (จากข้อที่ 1) ให้ทั่ว โดยป้ายทับไปมาหลาย ๆ ครั้ง ทิ้งไว้จนผิวหน้าอาหารแห้งดี (1 จาน ต่อเชื้อ 1 ชนิด)
4. ใช้ forceps จุ่ม 95% ethanol ผ่านไฟ ทิ้งไว้สักครู่จนเย็น นำมาคีบ paper disc ปลอดเชื้อไปแตะลงในสารเคมีที่จะทดสอบ จนสารเคมีซึมทั่วแผ่น paper disc
5. นำแผ่น paper disc ที่จุ่มสารเคมีแล้ว ไปวางบนอาหารที่ป้ายเชื้อไว้ (จากข้อที่ 3) ให้ตรงกับชื่อสารที่เขียนไว้ (ดังรูป) กดแผ่น paper disc เบา ๆ ด้วย forceps เพื่อให้ paper disc แนบติดผิวอาหารทั่วทั้งแผ่น
6. ทำเช่นนี้กับสารเคมีที่ใช้ในการทดสอบจนครบทุกชนิด สำหรับ control ให้คีบแผ่น paper disc ปลอดเชื้อที่ไม่ได้จุ่มสารเคมีวางลงไป



7. ทำเช่นนี้กับเชื้อทั้ง 4 ชนิดที่ใช้ในการทดสอบ จนครบ
8. นำจานอาหารทั้งหมดไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง ประมาณ 1-2 วัน แล้วตรวจผล

การตรวจผล

สังเกตบริเวณใส (inhibition zone) ที่อาจเกิดขึ้นรอบ ๆ แผ่น paper disc วัดเส้นผ่านศูนย์กลาง (mm) ของ inhibition zone ที่เกิดขึ้น บันทึกค่าที่ได้ลงในรายงานผลการทดลอง พร้อมทั้งสรุปความสามารถของสารเคมีแต่ละชนิดในการต้านเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบ เปรียบเทียบความทนทานของเชื้อแบคทีเรียทั้งสี่ต่อสารเคมีชนิดต่าง ๆ



มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

รายงานผลการทดลอง

บทปฏิบัติการเรื่องการควบคุมจุลินทรีย์

กลุ่มปฏิบัติการ.....วันที่.....

ชื่อ – สกุล.....รหัสประจำตัว.....

ชื่อ – สกุล.....รหัสประจำตัว.....

ชื่อ – สกุล.....รหัสประจำตัว.....

ตอนที่ 1 Physical methods

การทดลองที่ 1.1 ประสิทธิภาพของการทำ Pasteurization, Boiling และ Autoclaving ในการควบคุมจุลินทรีย์

อุณหภูมิ / เวลา	**เชื้อจุลินทรีย์**	
	E. coli	*B. subtilis*
หลอดคุม (control)		
63°C 30 นาที		
100°C 10 นาที		
121°C 15 นาที		

\+ = มีการเจริญ (ให้จำนวนของเครื่องหมาย + แทนการเจริญของเชื้อว่ามากหรือน้อย)

\- = ไม่มีการเจริญ

การทดลองที่ 1.2 ประสิทธิภาพของแสง Ultraviolet (UV) ในการควบคุมจุลินทรีย์

เชื้อจุลินทรีย์	**เวลาที่รับแสง UV (นาที)**			
	5		20	
	ครึ่งที่มีฝาจานปิด	ครึ่งที่ไม่มีฝาจานปิด	ครึ่งที่มีฝาจานปิด	ครึ่งที่ไม่มีฝาจานปิด
E. coli				
B. subtilis				
S. marcescens				
A. niger				

\+ = มีการเจริญ (ให้จำนวนของเครื่องหมาย + แทนการเจริญของเชื้อว่ามากหรือน้อย)

\- = ไม่มีการเจริญ

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตอนที่ 2 Chemical methods

การทดลองที่ 2.1 ประสิทธิภาพของสารเคมีชนิดต่าง ๆ ต่อการควบคุมจุลินทรีย์

เชื้อจุลินทรีย์	Inhibition zone (mm)					
	Control	Povidone-iodine	Formalin	Gentian violet	Hydrogen peroxide	70% ethanol
E. coli						
B. subtilis						
S. marcescens						
S. aureus						

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทปฏิบัติการเรื่อง
การทดสอบคุณสมบัติของแบคทีเรียเพื่อใช้ในการจำแนกชนิดของเชื้อ

ดร. นวรัตน์ นันทพงษ์

ปฏิกิริยาทางชีวเคมีที่พบในเซลล์แบคทีเรียนั้นมีอยู่ด้วยกันหลายชนิด โดยกระบวนการเหล่านี้มีความสำคัญต่อการดำรงชีวิตของเซลล์แบคทีเรีย ทำให้เซลล์สามารถสร้างพลังงานและองค์ประกอบต่าง ๆ ของเซลล์จากสารอาหารที่มีอยู่ในสิ่งแวดล้อมได้ อย่างไรก็ดีแบคทีเรียต่างชนิดกันก็จะมีกระบวนการทางชีวเคมีที่เกิดขึ้นภายในเซลล์แตกต่างกัน เนื่องจากแบคทีเรียต่างชนิดกันจะมีความสามารถในการสังเคราะห์เอนไซม์เพื่อนำมาใช้เร่งกระบวนการทางชีวเคมีเหล่านี้ได้แตกต่างกัน ส่งผลให้แบคทีเรียแต่ละชนิดมีคุณสมบัติเฉพาะตัวที่ต่างกันออกไป เช่น ความสามารถในการใช้สารอาหาร ความต้องการออกซิเจน ความสามารถในการสร้างสารผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ ที่เกิดขึ้นจากกระบวนการเมทาบอลิซึมของเซลล์ เป็นต้น ความแตกต่างเหล่านี้เป็นประโยชน์อย่างมากในการจัดจำแนกแบคทีเรีย จัดเป็นลักษณะสำคัญอย่างหนึ่งที่นำไปใช้ในการพิสูจน์ชนิดของเชื้อแบคทีเรีย ในทางการแพทย์สามารถใช้คุณสมบัติทางชีวเคมีเพื่อช่วยในการพิสูจน์ชนิดของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากสิ่งส่งตรวจของผู้ป่วย ทำให้แพทย์ทราบว่าผู้ป่วยติดเชื้อชนิดใด จะได้ทำการรักษาได้อย่างถูกต้องเหมาะสม

ในทางปฏิบัติ การที่จะพิสูจน์ชนิดของแบคทีเรียนั้นจะต้องใช้คุณสมบัติอื่นที่นอกเหนือจากคุณสมบัติทางชีวเคมีมาใช้ในการพิจารณาจำแนกชนิดของเชื้อด้วย เช่น คุณสมบัติทางสัณฐานวิทยา คุณสมบัติความเป็นแอนติเจนของเชื้อ และในบางกรณีอาจต้องใช้สมบัติทางพันธุกรรมโดยใช้เทคนิคทางอณูพันธุศาสตร์เป็นข้อมูลในการจำแนกชนิดของเชื้อด้วย โดยในบทปฏิบัติการนี้ นักศึกษาจะได้ทำการทดสอบคุณสมบัติพื้นฐานบางอย่างที่ใช้ในการพิสูจน์ชนิดของเชื้อแบคทีเรีย

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

วัตถุประสงค์การทดลอง

เพื่อให้นักศึกษาฝึกทำการทดสอบคุณสมบัติเบื้องต้นบางอย่างของแบคทีเรีย เพื่อที่สามารถนำไปใช้ประกอบการจำแนกชนิดของเชื้อได้

ตอนที่ 1 การใช้คาร์โบไฮเดรตในการเจริญ

คาร์โบไฮเดรต (carbohydrate) จัดเป็นสารชีวโมเลกุลที่มีโมเลกุลตั้งแต่ขนาดเล็กไปจนถึงขนาดใหญ่ ได้แก่ monosaccharide disaccharides starch cellulose เป็นต้น จุลินทรีย์สามารถใช้คาร์โบไฮเดรตเพื่อเป็นแหล่งของสารอาหารและพลังงาน ซึ่งแบคทีเรียแต่ละชนิดจะมีความสามรถแตกต่างกันในการนำคาร์โบไฮเดรตไปใช้ ดังนั้นจึงสามารถใช้คุณสมบัตินี้ในการจัดแบ่งประเภทและชนิดของแบคทีเรียได้

การทดลองที่ 1.1 ทดสอบการหมักย่อยน้ำตาลชนิดต่าง ๆ (Carbohydrate fermentation test)

แบคทีเรียแต่ละชนิดสามารถนำน้ำตาลชนิดต่าง ๆ ไปใช้เป็นแหล่งพลังงานได้ต่างกัน ซึ่งการหมักย่อยน้ำตาลโดยแบคทีเรียนั้นอาจได้กรด แก๊ส หรือสารผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ ที่อาจจะเหมือนหรือต่างกันก็ได้ ขึ้นอยู่กับชนิดของเอนไซม์ที่เชื้อสร้างได้ โดยในการทดลองนี้จะทำการทดสอบความสามารถในการหมักน้ำตาล glucose lactose และ sucrose ของเชื้อแบคทีเรียชนิดต่าง ๆ ว่าจะให้ผลผลิตใดบ้างจากกระบวนการหมักน้ำตาลเหล่านี้

วัสดุ อุปกรณ์ และ สารเคมี

1. อาหารที่ใช้ทดสอบ คือ อาหารเหลว Phenol red base medium 3 ชนิด

   1.1 Glucose phenol red base medium 5 หลอด

   1.2 Lactose phenol red base medium 5 หลอด

   1.3 Sucrose phenol red base medium 5 หลอด

   อาหารชนิดนี้มี phenol red เป็น pH indicator และในหลอดอาหารมีหลอดดักแก๊ส (Durham tube) คว่ำอยู่

2. ห่วงเขี่ยเชื้อ (loop)

เชื้อจุลินทรีย์

1. *Escherichia coli*
2. *Enterobacter aerogenes*
3. *Proteus vulgaris*
4. *Serratia marcescens*

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

วิธีการปฏิบัติ

1. เขียนรายละเอียดต่าง ๆ เช่น ชื่อเชื้อ หลอดคุม (control) วันที่ทำ หมู่ที่ ลงบนหลอดอาหารทุกชนิด
2. เพาะเชื้อที่จะทดสอบลงในหลอดอาหารทั้ง 3 ชนิด โดยให้มีหลอดคุมที่ไม่ได้ทำการเพาะเชื้อลงไปด้วย
3. นำหลอดอาหารที่เพาะเชื้อลงไปแล้ว ไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C นาน 1 วัน

การตรวจผล

ผลบวก

1. อาหารเปลี่ยนเป็นสีเหลือง แสดงว่าเชื้อหมักน้ำตาลแล้วได้กรด
2. เกิดแก๊สในหลอดดักแก๊ส แสดงว่าเชื้อหมักน้ำตาลแล้วได้แก๊ส

ผลลบ

อาหารไม่เปลี่ยนสี แสดงว่าเชื้อไม่สามารถหมักน้ำตาลที่มีในอาหารทดสอบได้

การทดลองที่ 1.2 การทดสอบ MR (Methyl Red (MR) test)

เป็นการทดสอบการใช้น้ำตาล glucose แล้วได้ผลผลิตสุดท้ายเป็นกรด ซึ่งสังเกตได้จากการเปลี่ยนสีของ methyl red ที่ใช้เป็น pH indicator โดยการทดสอบนี้มีประโยชน์ในการจำแนกเชื้อในกลุ่ม Enteric bacteria สามารถบอกความแตกต่างระหว่างเชื้อ *Escherichia coli* กับ *Enterobacter* spp. ได้

วัสดุ อุปกรณ์ และ สารเคมี

1. MR-VP broth 3 หลอด
2. ลวดเขี่ยเชื้อ
3. สารละลาย methyl red

เชื้อจุลินทรีย์

1. *Escherichia coli*
2. *Enterobacter aerogenes*

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

วิธีการปฏิบัติ

1. เขียนรายละเอียดต่าง ๆ เช่น ชื่อเชื้อ หลอดคุม (control) วันที่ทำ หมู่ที่ ลงบนหลอดอาหาร
2. เพาะเชื้อแต่ละชนิดลงในอาหาร MR-VP โดยเหลือไว้ 1 หลอดที่ไม่ได้ทำการเพาะเชื้อลงไป ให้เป็นหลอดคุม
3. นำเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 1 วัน

การตรวจผล

เติมสารละลาย methyl red ประมาณ 1 ml ลงไปในหลอดคุมและหลอดอาหารที่มีเชื้อเจริญอยู่

ผลบวก

อาหารเปลี่ยนเป็นสีแดงสด แสดงว่าเชื้อหมักน้ำตาลแล้วได้กรด

ผลลบ

เกิดสีเหลือง - ส้มเข้ม

การทดลองที่ 1.3 การทดสอบ VP (Voges-Proskauer (VP) test)

เป็นการทดสอบการใช้น้ำตาล glucose แล้วได้ผลผลิตสุดท้ายเป็น acetoine หรือ acetyl methyl carbinol ซึ่งเป็นผลผลิตที่มี pH เป็นกลาง การตรวจ VP นิยมตรวจร่วมกับ MR test จึงเรียก MR-VP test นิยมใช้เพื่อจำแนกเชื้อในกลุ่ม Enterobacteriaceae

วัสดุ อุปกรณ์ และ สารเคมี

1. MR-VP broth 3 หลอด
2. ลวดเขี่ยเชื้อ
3. สารละลาย 10% α-napthol
4. สารละลาย 20% potassium hydroxide

เชื้อจุลินทรีย์

1. *Escherichia coli*
2. *Enterobacter aerogenes*

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

วิธีการปฏิบัติ

1. เขียนรายละเอียดต่าง ๆ เช่น ชื่อเชื้อ หลอดคุม (control) วันที่ทำ หมู่ที่ ลงบนหลอดอาหาร
2. เพาะเชื้อแต่ละชนิดลงในอาหาร MR-VP โดยเหลือไว้ 1 หลอดที่ไม่ได้ทำการเพาะเชื้อลงไป ให้เป็นหลอดคุม
3. นำเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 1 วัน

การตรวจผล

เติมสารละลาย 10% α-napthol ประมาณ 1 ml และ 20% potassium hydroxide ประมาณ 1 ml ลงไปในหลอดคุมและหลอดอาหารที่มีเชื้อเจริญอยู่ เขย่าให้เข้ากัน

ผลบวก

อาหารเปลี่ยนเป็นสีแดงภายใน 5 นาที

ผลลบ

สีเหลือง

การทดลองที่ 1.4 การทดสอบการย่อยแป้ง (Starch hydrolysis test)

แป้งเป็นคาร์โบไฮเดรตที่ประกอบด้วย amylose และ amylopectin มีขนาดโมเลกุลใหญ่ โดยแบคทีเรียบางชนิดสามารถสร้างเอนไซม์ amylase ออกมาภายนอกเซลล์ เพื่อย่อยแป้งให้เป็นน้ำตาลที่มีขนาดโมเลกุลเล็กลง เพื่อที่เซลล์แบคทีเรียจะได้สามารถนำน้ำตาลเหล่านี้เข้าไปใช้ภายในเซลล์ได้

วัสดุ อุปกรณ์ และ สารเคมี

1. Starch agar plate 1 จาน
2. ห่วงเขี่ยเชื้อ
3. น้ำยาไอโอดีน

เชื้อจุลินทรีย์

1. *Escherichia coli*
2. *Enterobacter aerogenes*
3. *Bacillus cereus*

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

วิธีการปฏิบัติ

1. ใช้ปากกาเขียนแก้วแบ่งด่านล่างของจานอาหารออกเป็น 4 ส่วน เขียนชื่อเชื้อแต่ละชนิดกำกับไว้ในแต่ละส่วน ที่เหลืออีกส่วนเป็น control (อย่าลืมเขียนรายละเอียดอื่น ๆ ที่สำคัญไว้ด้วย)
2. เพาะเชื้อแต่ละชนิดลงบนผิวอาหาร ตามชื่อที่เขียนกำกับไว้ ส่วนที่เป็น control ไม่ต้องเพาะเชื้อ (การเพาะเชื้ออาจทำโดยใช้ห่วงเขี่ยเชื้อขีดลากเชื้อเป็นแนวยาว 1 แนว)
3. นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 1 วัน

การตรวจผล

เทน้ำยาไอโอดีนลงในจานอาหารที่มีเชื้อเจริญอยู่

<u>ผลบวก</u>

อาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงิน แต่บริเวณรอบ/ใต้โคโลนีจะใส ไม่มีสี (clear zone)

<u>ผลลบ</u>

อาหารเลี้ยงเชื้อโดยรอบ/ใต้โคโลนีเป็นสีน้ำเงิน

ตอนที่ 2 การใช้โปรตีนในการเจริญ

แบคทีเรียสามารถย่อยโปรตีนได้กรดอะมิโนที่สามารถนำมาใช้เป็นสารอาหารสำหรับการเจริญเติบโตของเซลล์ได้ โดยแบคทีเรียแต่ละชนิดจะมีความสามารถในการสร้างเอนไซม์เพื่อย่อยโปรตีนได้แตกต่างกัน จึงเป็นคุณสมบัติเฉพาะที่นำมาใช้เพื่อจำแนกชนิดของแบคทีเรียได้

การทดลองที่ 2.1 การทดสอบ Indole (Indole test)

เป็นการทดสอบความสามารถของแบคทีเรียในการสร้าง indole จากกรดอะมิโน tryptophane โดยเชื้อที่สามารถสร้างเอนไซม์ tryptophanase ได้ จะสามารถใช้เอนไซม์ชนิดนี้ในการย่อย tryptophane ให้เป็น สารผลิตภัณฑ์หลายชนิดรวมถึง indole ในการทดสอบว่ามี indole เกิดขึ้นหรือไม่จะทำได้โดยหยดน้ำยา Kovac's (dimethylaminobenzaldehyde) ลงในหลอดที่เพาะเชื้อไว้ ซึ่งสารเคมีในน้ำยาจะทำปฏิกิริยากับ indole เกิดเป็นสารสีม่วงแดง นิยมใช้เพื่อจำแนกเชื้อในกลุ่ม Enterobacteriaceae

วัสดุ อุปกรณ์ และ สารเคมี

1. Tryptone broth 3 หลอด
2. ลวดเขี่ยเชื้อ
3. Kovac's reagent

เชื้อจุลินทรีย์

1. *Escherichia coli*
2. *Enterobacter aerogenes*

วิธีการปฏิบัติ

1. เขียนรายละเอียดต่าง ๆ เช่น ชื่อเชื้อ หลอดคุม (control) วันที่ทำ หมู่ที่ ลงบนหลอดอาหาร
2. เพาะเชื้อแต่ละชนิดลงใน Tryptone broth โดยเหลือไว้ 1 หลอดที่ไม่ได้ทำการเพาะเชื้อลงไป ให้เป็นหลอดคุม
3. นำเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 1 วัน

การตรวจผล

เติม Kovac's reagent ประมาณ 1 ml ลงไปในหลอดคุมและหลอดอาหารที่มีเชื้อเจริญอยู่

ผลบวก

เกิดวงแหวนสีม่วงแดงบนชั้นเหนืออาหารเลี้ยงเชื้อ

ผลลบ

ไม่มีสี หรือเกิดวงแหวนสีเหลืองบนชั้นเหนืออาหารเลี้ยงเชื้อ

การทดลองที่ 2.2 การทดสอบการย่อย Gelatin (Gelatin liquefaction test)

Gelatin เป็น insoluble protein ที่ได้จาก collagen สามารถเปลี่ยนเป็น soluble ได้โดยการนำไปต้ม และสามารถแข็งตัวเป็นวุ้นเมื่ออุณหภูมิต่ำกว่า 20°C แบคทีเรียที่สร้างเอนไซม์ gelatinase จะมีความสามารถในการย่อย gelatin ให้เป็นหน่วยย่อย ๆ ของโปรตีน ซึ่งก็คือ polypeptides และ กรดอะมิโน ทำให้ gelatin เสียคุณสมบัติการแข็งตัวเป็นวุ้นที่อุณหภูมิต่ำ

วัสดุ อุปกรณ์ และ สารเคมี

1. Nutrient gelatin medium 3 หลอด
2. ลวดเขี่ยเชื้อ

เชื้อจุลินทรีย์

1. *Enterobacter aerogenes*
2. *Serratia marcescens*

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

วิธีการปฏิบัติ

1. เขียนรายละเอียดต่าง ๆ เช่น ชื่อเชื้อ หลอดคุม (control) วันที่ทำ หมู่ที่ ลงบนหลอดอาหาร
2. เพาะเชื้อแต่ละชนิดลงใน nutrient gelatin โดยเหลือไว้ 1 หลอดที่ไม่ได้ทำการเพาะเชื้อลงไป ให้เป็นหลอดคุม
3. นำเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 1 วัน

การตรวจผล

นำหลอดคุมและหลอดอาหารที่มีเชื้อเจริญอยู่ไปบ่มในตู้เย็นประมาณ 15 นาที แล้วนำออกมาตรวจดูว่าอาหารแข็งตัวหรือไม่ โดยเทียบกับ control (หลอดคุม)

<u>ผลบวก</u>

อาหารมีลักษณะเหลว

<u>ผลลบ</u>

อาหารแข็งตัวเป็นวุ้น

การทดลองที่ 2.3 การทดสอบการสร้างแก๊ส H_2S (Hydrogen sulfide (H_2S) production test)

แบคทีเรียบางชนิดอาจสร้าง H_2S จากสารอินทรีย์ เช่น กรดอะมิโน cysteine หรือสารอนินทรีย์ที่มีซัลเฟอร์เป็นองค์ประกอบ ซึ่ง H_2S เกิดมาจากการที่แบคทีเรียสามารถสร้างเอนไซม์มารีดิวซ์สารประกอบ sulfur ไปเป็น sulfide วิธีการตรวจสอบ H_2S ที่เกิดขึ้นอาศัยหลักการที่ว่าเกลือซัลไฟด์ของโลหะหนัก เช่น ตะกั่ว (Pb) เหล็ก (Fe) เป็นสีดำ ดังนั้นจะมีการเติมสารประกอบอิออนของโลหะหนักเหล่านี้ลงไปในอาหารที่ใช้ทดสอบแล้วตรวจผลการสร้าง H_2S จากการที่อาหารเปลี่ยนเป็นสีดำ

วัสดุ อุปกรณ์ และ สารเคมี

1. Lead acetate agar 3 หลอด
2. ลวดเขี่ยเชื้อปลายตรง (needle)

เชื้อจุลินทรีย์

1. *Enterobacter aerogenes*
2. *Proteus vulgaris*

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

วิธีการปฏิบัติ

1. เขียนรายละเอียดต่าง ๆ เช่น ชื่อเชื้อ หลอดคุม (control) วันที่ทำ หมู่ที่ ลงบนหลอดอาหาร
2. เพาะเชื้อแต่ละชนิดลงใน lead acetate agar โดยใช้วิธีการ stab โดยเหลือไว้ 1 หลอดที่ไม่ได้ทำการเพาะเชื้อลงไป ให้เป็นหลอดคุม
3. นำเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 1 วัน

การตรวจผล

ผลบวก

อาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนเป็นสีดำ

ผลลบ

อาหารเลี้ยงเชื้อไม่เปลี่ยนสี

การทดลองที่ 2.4 การทดสอบการย่อยโปรตีนเคซีน (Casein hydrolysis test)

เคซีน (casein) เป็นโปรตีนที่พบในนม โดยแบคทีเรียบางชนิดสามารถสร้างเอนไซม์ caseinase ออกมาย่อยเคซีนให้เป็นกรดอะมิโนที่มีโมเลกุลเล็กลง เพื่อที่เซลล์สามารถดูดซึมเข้าไปใช้ภายในเซลล์ได้

วัสดุ อุปกรณ์ และ สารเคมี

1. Skimmed milk agar plate 1 จาน
2. ห่วงเขี่ยเชื้อ

เชื้อจุลินทรีย์

1. *Escherichia coli*
2. *Enterobacter aerogenes*
3. *Bacillus cereus*

วิธีการปฏิบัติ

1. ใช้ปากกาเขียนแก้วแบ่งด้านล่างของจานอาหารออกเป็น 4 ส่วน เขียนชื่อเชื้อแต่ละชนิดกำกับไว้ในแต่ละส่วน ที่เหลืออีกส่วนเป็น control (อย่าลืมเขียนรายละเอียดอื่น ๆ ที่สำคัญไว้ด้วย)
2. เพาะเชื้อแต่ละชนิดลงบนผิวอาหาร ตามชื่อที่เขียนกำกับไว้ ส่วนที่เป็น control ไม่ต้องเพาะเชื้อ (การเพาะเชื้ออาจทำโดยใช้ห่วงเขี่ยเชื้อขีดลากเป็นเส้นยาว 1 เส้น)
3. นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 1 วัน

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

การตรวจผล

ผลบวก

พบบริเวณใสเกิดขึ้นรอบ ๆ โคโลนี

ผลลบ

ไม่พบบริเวณใสรอบโคโลนี

ตอนที่ 3 การสร้างเอนไซม์อื่น

การทดลองที่ 3.1 การทดสอบการสร้างเอนไซม์ Catalase (Catalase test)

เป็นการตรวจสอบการสร้างเอนไซม์ catalase ของแบคทีเรีย โดยเอนไซม์จากเชื้อจะสลาย H_2O_2 ได้เป็น H_2O กับ O_2 (เห็นเป็นฟองแก๊ส) การทดสอบนี้มักใช้ในการแยกแบคทีเรียกลุ่ม Staphylococci ออกจาก Streptococci แต่ก็สามารถใช้จำแนกเชื้อชนิดอื่น ๆ ด้วย

วัสดุ อุปกรณ์ และ สารเคมี

1. แผ่นสไลด์
2. ห่วงเขี่ยเชื้อ
3. 3% H_2O_2

เชื้อจุลินทรีย์

1. *Escherichia coli*
2. *Enterobacter aerogenes*
3. *Staphylococcus aureus*
4. *Streptococcus lactis* (ทำเชื้อนี้ในกรณีที่มีตัวอย่างเชื้อให้)

วิธีการปฏิบัติ

1. ใช้ห่วงเขี่ยเชื้อ แตะเชื้อที่ต้องการทดสอบ แล้วป้ายลงบนสไลด์
2. หยด 3% H_2O_2 ลงไปบนเชื้อ แล้วสังเกตผล

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

การตรวจผล

ผลบวก

เกิดฟองแก๊ส

ผลลบ

ไม่เกิดฟองแก๊ส

ตอนที่ 4 การทดสอบคุณสมบัติที่สำคัญอื่น ๆ

การทดลองที่ 4.1 การทดสอบการเคลื่อนที่ (Motility test)

แบคทีเรียหลายชนิดมีแฟลกเจลลา ทำให้สามารถเคลื่อนที่ได้ โดยคุณสมบัตินี้ตรวจสอบได้จากการเพาะเชื้อลงไปในอาหารกึ่งแข็ง (semi-solid medium) และสังเกตลักษณะการเจริญ

วัสดุ อุปกรณ์ และ สารเคมี

1. Motility test medium 3 หลอด
2. ลวดเขี่ยเชื้อปลายตรง (needle)

เชื้อจุลินทรีย์

1. *Escherichia coli*
2. *Staphylococcus aureus*

วิธีการปฏิบัติ

1. ใช้ลวดเขี่ยเชื้อ แตะเชื้อที่ต้องการทดสอบ stab ลงในอาหารทดสอบ โดยเหลือไว้ 1 หลอดที่ไม่ได้ทำการเพาะเชื้อลงไป ให้เป็นหลอดคุม
2. นำไปบ่มที่ 37^{o}C เป็นเวลา 1 วัน

การตรวจผล

ผลบวก

มีการเจริญของเชื้อแผ่ออกมาจากแนวที่แทงเชื้อ บางกรณีอาจเห็นอาหารเลี้ยงเชื้อขุ่นเกือบทั้งหลอดและมองไม่เห็นรอยแทงเชื้อ

ผลลบ

พบเชื้อเจริญขุ่นอยู่ตามแนวที่แทงเชื้อ รอบ ๆ รอยแทงอาหารยังคงใส

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

การทดลองที่ 4.2 การทดสอบลักษณะของโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Eosin methylene blue agar (EMB)

มักใช้เพื่อศึกษาเชื้อที่ผ่านการทดสอบเบื้องต้นอื่น ๆ มาแล้ว เพื่อทำการจำแนกและตรวจดูลักษณะโคโลนีที่จำเพาะของ coliform bacteria โดย *Escherichia coli* จะให้ลักษณะโคโลนีเป็นสีเขียวเข้ม หรือ เกือบดำ เป็นเงาโลหะ (metallic sheen) ส่วน coliform ในกลุ่ม *Enterobacter* spp. จะให้โคโลนีทึบแสง เยิ้มเป็นเมือกสีชมพู

วัสดุ อุปกรณ์ และ สารเคมี

1. EMB agar
2. ห่วงเขี่ยเชื้อ

เชื้อจุลินทรีย์

1. *Escherichia coli*
2. *Enterobacter aerogenes*
3. *Staphylococcus aureus*

วิธีการปฏิบัติ

1. ใช้ปากกาเขียนแก้วแบ่งด้านล่างของจานอาหารออกเป็น 4 ส่วน เขียนชื่อเชื้อแต่ละชนิดกำกับไว้ในแต่ละส่วน ที่เหลืออีกส่วนเป็น control (อย่าลืมเขียนรายละเอียดอื่น ๆ ที่สำคัญไว้ด้วย)
2. เพาะเชื้อแต่ละชนิดลงบนผิวอาหาร ตามชื่อที่เขียนกำกับไว้ ส่วนที่เป็น control ไม่ต้องเพาะเชื้อ (การเพาะเชื้ออาจทำโดยใช้ห้วงเขี่ยเชื้อขีดลากเป็นเส้นยาว 1 เส้น)
3. นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 1 วัน

การตรวจผล

<u>ผลบวก</u>

พบเชื้อเจริญให้โคโลนีแบบ metallic sheen หรือ เยิ้มเป็นเมือกสีชมพู

<u>ผลลบ</u>

ไม่พบการเจริญของเชื้อ หรือโคโลนีของเชื้อมีลักษณะอื่นนอกเหนือจากที่กล่าวมาข้างต้น

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ภาคผนวก

อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการทดสอบ

1. Eosin-methylene blue (EMB) agar

Peptone	10.0	กรัม
Lactose	5.0	กรัม
Dipotassium phosphate	2.0	กรัม
Agar	13.5	กรัม
Eosin	0.4	กรัม
Methylene blue	0.065	กรัม
Distilled water	1000.0	มิลลิลิตร

2. Lead acetate agar

Peptone	20.0	กรัม
Disodium phosphate	2.0	กรัม
Glucose	1.0	กรัม
Lead acetate	0.2	กรัม
Agar	15.0	กรัม
Distilled water	1000.0	มิลลิลิตร

3. Motility test medium

Tryptone	10.0	กรัม
Sodium chloride	5.0	กรัม
Agar	5.0	กรัม
Distilled water	1000.0	มิลลิลิตร

4. MR-VP broth

Peptone	7.0	กรัม
Glucose	5.0	กรัม
Dipotassium phosphate	5.0	กรัม
Distilled water	1000.0	มิลลิลิตร

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

5. Nutrient gelatin

Beef extract	3.0	กรัม
Peptone	5.0	กรัม
Gelatin	120.0	กรัม
Distilled water	1000.0	มิลลิลิตร

6. Phenol red base medium + sugar

Beef extract	1.0	กรัม
Peptone	10.0	กรัม
Sodium chloride	5.0	กรัม
Phenol red	0.018	กรัม
Sugar	5.0	กรัม
Distilled water	1000.0	มิลลิลิตร

ปริมาณน้ำตาลที่จะเติมอาจเป็น 0.5-1.0%

7. Skimmed milk agar

Skimmed milk	2.0	กรัม
Glucose	1.0	กรัม
K_2HPO_4	0.2	กรัม
$MgSO_4.7H_2O$	0.2	กรัม
$FeSO_4$	trace	
Agar	15.0	กรัม
Distilled water	1000.0	มิลลิลิตร

8. Starch agar

Soluble starch	2.0	กรัม
Beef extract	3.0	กรัม
Peptone	5.0	กรัม
Agar	15.0	กรัม
Distilled water	1000.0	มิลลิลิตร

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

9. Tryptone broth

Tryptone	5.0	กรัม
Glucose	1.0	กรัม
Distilled water	1000.0	มิลลิลิตร

สารเคมีที่ใช้ในการทดสอบ

1. Hydrogen peroxide (3% solution)

Hydrogen peroxide	3.0	กรัม
Distilled water	100.0	มิลลิลิตร

2. Iodine solution

Iodine	1.0	กรัม
Potassium iodide (KI)	2.0	กรัม
Distilled water	300.0	มิลลิลิตร

3. Kovac's reagent

Para-dimethylamino-benzaldehyde	5.0	กรัม
Amyl or Butyl alcohol	75.0	มิลลิลิตร
Hydrochloric acid (conc.)	25.0	มิลลิลิตร

4. Methyl red solution

Methyl red	0.1	กรัม
Ethanol (95%)	300.0	มิลลิลิตร
Distilled water	200.0	มิลลิลิตร

5. Voges-Proskauer test solution

Solution A: Alpha-napthol solution

Alpha-napthol	10.0	กรัม
Ethanol (95%)	100.0	มิลลิลิตร

Solution B: KOH (20% solution)

KOH	20.0	กรัม
Distilled water	100.0	มิลลิลิตร

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

รายงานผลการทดลอง

กลุ่มปฏิบัติการที่.....วันที่.....

ชื่อ-สกุล.....รหัสประจำตัว.....

ชื่อ-สกุล.....รหัสประจำตัว.....

ชื่อ-สกุล.....รหัสประจำตัว.....

ตอนที่ 1 การใช้คาร์โบไฮเดรตในการเจริญ

การทดลองที่ 1.1 ทดสอบการหมักย่อยน้ำตาลชนิดต่าง ๆ (Carbohydrate fermentation test)

จุลินทรีย์	Phenol red base medium		
	glucose	lactose	sucrose

การทดลองที่ 1.2 การทดสอบ MR (Methyl Red (MR) test)

จุลินทรีย์	ผลการทดสอบ MR

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

การทดลองที่ 1.3 การทดสอบ VP (Voges-Proskauer (VP) test)

จุลินทรีย์	ผลการทดสอบ VP

การทดลองที่ 1.4 การทดสอบการย่อยแป้ง (Starch hydrolysis test)

จุลินทรีย์	ผลการทดสอบการย่อยแป้ง

ตอนที่ 2 การใช้โปรตีนในการเจริญ

การทดลองที่ 2.1 การทดสอบ Indole (Indole test)

จุลินทรีย์	ผลการทดสอบ Indole

การทดลองที่ 2.2 การทดสอบการย่อย Gelatin (Gelatin liquefaction test)

จุลินทรีย์	ผลการทดสอบการย่อย gelatin

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

การทดลองที่ 2.3 การทดสอบการสร้างแก๊ส H_2S (Hydrogen sulfide (H_2S) production test)

จุลินทรีย์	ผลการทดสอบการสร้าง H_2S

การทดลองที่ 2.4 การทดสอบการย่อยโปรตีนเคซีน (Casein hydrolysis test)

จุลินทรีย์	ผลการทดสอบการย่อยโปรตีนเคซีน

ตอนที่ 3 การสร้างเอนไซม์อื่น

การทดลองที่ 3.1 การทดสอบการสร้างเอนไซม์ Catalase (Catalase test)

จุลินทรีย์	ผลการทดสอบการสร้างเอนไซม์ catalase

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตอนที่ 4 การทดสอบคุณสมบัติที่สำคัญอื่น ๆ

การทดลองที่ 4.1 การทดสอบการเคลื่อนที่ (Motility test)

จุลินทรีย์	ผลการทดสอบการเคลื่อนที่

การทดลองที่ 4.2 การทดสอบลักษณะของโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Eosin methylene blue agar

จุลินทรีย์	ลักษณะของโคโลนีบน EMB agar

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง